

임상가검물에서 분리한 *Stenotrophomonas maltophilia*의 유전적 다양성

경북대학교 의과대학 미생물학교실

장경수 · 오재영 · 강희영 · 진종숙 · 설성용 · 김정민 · 이제철 · 조동택 · 이유철*

Genetic Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Clinical Specimens

Kyoung Soo Jang, Jae Young Oh, Hee Young Kang, Jong Sook Jin, Sung Yong Seol,
Jungmin Kim, Je Chul Lee, Dong Taek Cho and Yoo Chul Lee*

Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu 700-422, Korea

Received : February 26, 2007

Accepted : March 30, 2007

Stenotrophomonas maltophilia is a multi-drug resistant pathogen that has been isolated with increasing frequency from the hospitalized patients. A total of 202 *S. maltophilia* was isolated from three university hospitals and analysed by molecular typing for an epidemiologic investigation. All isolates were tested by antimicrobial susceptibility, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The RAPD and PFGE patterns were recorded and analysed by the unweighted-pair group method with arithmetic average method. Two or more isolates were considered to be clonally related if their PFGE pattern exhibited $\geq 80\%$ similarity. Trimethoprim/sulfamethoxazole and ciprofloxacin were the most active antimicrobial agents tested. The majority of the isolates found to be genetically unrelated by PFGE. The genetically related isolates were recovered from the same patient. The result demonstrates a high genetic diversity of *S. maltophilia* isolates from clinical specimens. The clonal diversity of *S. maltophilia* from the hospitalized patients is partly due to the strains originated from the hospital environments, but not horizontal transfer between the patients.

Key Words: Genetic diversity, PFGE, *Stenotrophomonas maltophilia*

서 론

Xanthomonadaceae 과에 속하는 *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) 균종은 녹농균과 세균학적 특징이 유사하다. 이 균종은 토양, 우물이나 강물, 하수 등의 자연계에 널리 서식하고 있다. 근래에 *S. maltophilia*는 높은 치명률을 보이는 병원감염의 원인균으로 분리빈도가 증가하여 병원감염의 혼란 원인균종의 하나로 주목받고 있으며, 주로 분리되

는 병원환경으로는 수도꼭지, 배수구, 인공호흡기 및 소독용 액과 같은 습한 환경이다 (12,20).

*S. maltophilia*는 외상이나 수술 후 창상감염, 심내막염, 균혈증, 수막염, 요로감염이나 호흡기감염에서 분리된다. 숙주의 면역능력이 저하되거나 광범위 항균제의 장기치료 시에 이 균에 감염될 위험성이 높아지는데, 감염의 위험인자는 항생제 투여, 삽관 및 호흡 보조장치의 사용, 장기간의 입원, 중환자실 입원 등이다 (9,25). 그러나 이 균의 독성은 높지 않으므로 건강인으로 구성된 지역사회에서 발생하는 감염은 병원감염에 비하여 드물다.

이 균의 감염이 문제가 되는 이유는 최근 사용되는 광범위 항생제에 대한 자연 내성으로 치료약제 선택의 폭이 아주 제한된다는 것이다. *S. maltophilia*는 세균감염에 가장 효과적인 항생제로 널리 사용되는 beta-lactam 항균제에 높은 내성

*교신저자: 이유철, 700-422, 대구광역시 중구 동인동2가 101번지, 경북대학교 의과대학 미생물학교실

Phone: +82-53-420-4843, Fax: +82-53-427-5664,
e-mail: yclee@knu.ac.kr

**이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-002-E00049).

을 나타내며, 아미노배당체에도 고도의 다약제 내성을 나타낸다고 알려져 있다. 현재 이 균에 의한 감염의 치료약제로 권장되고 있는 항균제는 trimethoprim/sulfamethoxazole (Tp/Su), quinolone, moxalactam 그리고 ticarcillin과 clavulanic acid 병합제 등이다 (15). *S. maltophilia* 균의 다약제 내성을 근래 까지 비전달성인 자연 내성으로 알려져 왔으나, 최근 병원에서 분리된 일부 균주에서는 혼합배양에 의해 3세대 cephalosporin과 monobactam 등 새로운 광범위 β -lactam 항균제와 아미노배당체 항균제에 대한 내성이 *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* 등에 전달될 수 있음이 확인되어 병원내 감염 병원균으로서 역학적으로 중요한 위치를 차지하게 되었다 (2).

*S. maltophilia*에 의한 병원감염의 경로를 추적하기 위한 조사에 사용되는 문자역학 조사방법으로는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR과 ribotyping 등이 사용되어 왔다 (4,6,12,18,27). PFGE법은 가장 정확한 방법으로 알려져 있으나, 시행에 소요되는 시간과 방법의 어려움으로 일상적으로 시행하기는 어려운 점이 있다. 반면에 RAPD-PCR법은 신속한 방법으로 쉽게 시행할 수 있는 장점이 있으나, 결과의 일관성에 문제가 있다고 알려져 있다. 따라서 이번 연구에서는 두 가지 방법을 모두 시행한 다음, 결과를 분석하여 감염의 감시체계 수립에 적합한 방법을 제시하고자 하였다.

이번 연구에서는 같은 지역에 있는 2개의 3차 의료기관과 지역적으로 떨어져 있는 3차 의료기관에 입원한 환자의 검체에서 분리된 *S. maltophilia*를 대상으로 균종을 동정하고, 항생제 내성 양상을 조사한 다음, 유전형 검사인 PFGE와 RAPD-PCR을 시행하였다. 이 결과를 임상자료와 비교 분석하여 집단 또는 산발감염의 여부를 파악하고, 유전형을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 임상검체 분리균주

1994년에서 1998년 그리고 2001년에서 2006년 사이에 대구광역시에 소재하는 3차 의료기관 2개소와 천안지역 3차 의료기관 1개소의 환자검체에서 분리된 균주를 사용하였다 (Table 1). 각 의료기관의 진단검사의학과 미생물검사실에서 *S. maltophilia*로 동정이 된 균주 202주를 사용하였다. 수집된 모든 균주는 순수배양한 후 API (bioMerieux SA, France) 20NE kit를 이용하여 생화학적 성상을 확인하였고, Whitby 등 (28)의 23S rRNA의 염기서열을 근거로 고안한 *S. maltophilia* 균종 특이적 PCR을 시행하여 유전적 성상을 확인하였다.

Table 1. *S. maltophilia* isolates from clinical specimens used in this study

Area	Hospital	No. of isolates		Total
		1994~1998	2001~2006	
Daegu	KY	61	109	170
	DS	6	-	6
Cheonan	DA	-	26	26

2. 항생제 감수성 검사

실험에 사용한 항생제는 antifolate 계열의 sulfamethoxazole (Su, ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA), trimethoprim (Tp, ICN Biomedicals) 및 aminoglycoside 계열의 streptomycin (Sm, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), kanamycin (Km, DUCHEFA, Haarlem, Netherland), gentamicin (Gm, DUCHEFA), tobramycin (Tb, Amresco, Solon, OH, USA), amikacin (Ak, ICN Biomedicals), β -lactams 계열의 ampicillin (Ap, USB, Cleveland, OH, USA), ampicillin/sulbactam (Ap/sul, 한국유니온제약, 서울, 대한민국), piperacillin (Pi, ICN Biomedicals), cefoxitin (Cx, Sigma Chemical Co.), cefotaxime (Ct, DUCHEFA), ceftazidime (Cd, Sigma Chemical Co.), aztreonam (Az, ICN Biomedicals), imipenem (Ip, 한국 MSD, 서울, 대한민국), quinolone 계열의 ciprofloxacin (Cip, Fluka, Buchs, Switzerland)이며, chloramphenicol (Cm)과 tetracycline (Tc, Sigma Chemical Co.)을 포함하여 총 18종의 항생제를 실험에 사용하였다. 항균제 감수성 검사는 Mueller-Hinton agar (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용한 평판희석법에 의하였다. 항생제 감수성과 내성의 판정의 기준이 되는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 과거 National Committee for Clinical Laboratory Standards) (21)의 기준에 따라 항생제가 첨가된 우무배지에 접종한 다음 37°C에서 20시간 배양 후 접종부위의 균 발육 유무를 보아 내성 여부를 결정하였다.

3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 분석

균을 trypticase soy agar (Becton, Dickinson and Company)에 하룻밤 배양한 후, 식염수로 세척하고 증류수에 부유시켜 100°C에서 10분간 가열한 다음 4°C에 보관하였다. 반응물의 조성은 PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂), 1 μ l 당 0.025 U의 *Taq* polymerase (TaKaRa Shuzo Co. Ltd., Tokyo, Japan), 각 200 mM의 dATP, dGTP, dTTP, dCTP와 1 μ M의 primer A (5'-AATCGGGCTG-3')가 25 μ l의 reaction mixture에 포함되도록 하였다. PCR 반응 조건은 초기 denaturation step을 94°C에서 2분 동안 반응시킨 다음, DNA denaturation 반응을 94°C에서 30초, primer annealing 반

응을 35°C에서 30초, 그리고 extension 반응을 72°C에서 1분 동안 시행하였고, 총 35회 반복하였다. 마지막 extension 반응을 72°C에서 4분간 시행하였다. 결과의 재현성을 확인하기 위하여 PCR 반응을 두 번 반복하였다.

4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 검사

고형배지에서 한 개의 접락을 취해서 trypticase soy broth (Becton, Dickinson and Company)에 하룻밤 배양한 배양액을 원침한 다음 OD₆₀₀ 값이 0.8이 되도록 TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0)에 혼탁하였다. 균액에 lysozyme (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 각각 1 mg/ml로 되도록 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 동량의 2% InCert agarose (FMC, Rockland, ME, USA)를 균 부유액과 혼합하여 agarose의 최종농도가 1%가 되게 한 후, plug mold에 분주하여 plug를 만들었다. Lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% sarcosine, 1 mg/ml proteinase K)에 plug를 넣고, 55°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 종류수로 세척한 plug를 5 mm 폭으로 자른 후, 제한효소 buffer H (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에 넣고 반응시킨 다음, 제한효소 *Xba*I 또는 *Spe*I (Roche Diagnostics GmbH)를 첨가하여 24시간 처리하였다. CHEF-DR III system (Bio-Rad Co, Hercules, CA, USA)에서 initial pulse 5초, final pulse 40초, 6 V/cm, angle 120° 조건으로 12°C에서 20시간 전기영동하였다.

5. 유전형 자료의 처리 및 분석

디지털화된 사진 자료는 Applied Maths사 (Sint-Martens-Latem, Belgium)의 GelCompar II 프로그램을 이용하여 분석하고 database화 하였다. 분석 및 비교 대상은 48~500 kb 크기의 절편으로 한정하였으며, lambda 48.5 kb ladder DNA (Roche Diagnostics GmbH)의 전기영동양상을 종합하여 reference point를 결정하였다. 밴드를 비교하는 Dice 방법을 사용하여 유사성 계수를 산출하여 unweighted-pair group method with arithmetic average (UPGMA)에 따라 dendrogram을 작성하였다.

결 과

1. 균주의 임상적 특성

*S. maltophilia*가 주로 분리된 검체는 객담과 호흡기 관련 검체가 전체의 1/3 이상을 차지하여 가장 많았으며, 소변이 2번째로 흔한 검체였고, 고름, 혈액 등의 순이었다 (Table 2). 결과는 제시하지 않았지만, 2004~2005년 사이에 분리된 59주

Table 2. Prevalence of *S. maltophilia* isolates according to clinical specimens

Specimen	No. of isolates		Total (%)
	1994~1998	2001~2006	
Sputum & respiratory tract	21	55	76 (37.6)
Urine	9	10	19 (9.4)
Pus	2	7	9 (4.5)
Blood	-	7	7 (3.5)
Ascitic fluid	4	2	6 (3.0)
Pleural fluid	4	2	6 (3.0)
Wound	5	-	5 (2.5)
Others	12	12	24 (11.9)
Unknown	10	40	50 (24.8)
Total	67	135	202 (100.0)

의 월별 분리 현황을 살펴보면, 균주가 가장 많이 분리된 달은 매년 7월이었으며, 41주 (69%)가 여름철인 6~8월 사이에 분리되었다. 병동에 따른 균의 분포는 중환자실 (내과, 외과 및 신생아 중환자실 포함)에서 분리된 것이 20주, 일반병실에서 분리된 것이 25주, 응급실에서 분리된 것이 6주였으며, 병실을 확인하지 못한 것이 8주 있었다.

2. 항균제 내성 양상

실현한 균주들의 항생제별 내성빈도를 분리연도와 병원으로 나누어 61주의 1990년대 KY 병원 분리주 (KY1990), 109주의 2000년대 KY 병원 분리주 (KY2000), 26주의 2003년 DA 병원 분리주 (DA2003)의 3개의 균으로 정리하였다 (Fig. 1). 대부분의 균주가 감수성을 나타낸 항균제는 Tp/Su 및 Cip, 최근에는 일반적으로 사용되지 않는 Cm과 Tc이었다. 대부분의 균주가 β -lactam 항균제인 Ap, Cx, Az, Ip 등에는 내성을 나타내었으며, 절반 이상의 균주가 Cd에 내성이었고, 약 70%의 균주가 Pi에 내성이었다. 아미노배당체 항균제에 대한 내성빈도를 살펴보면 Ak에 대한 내성빈도가 약 30%로 가장 낮았으며, Km, Gm, Tb에 대한 내성빈도는 50~70%였다. 현재 이 균의 치료제로 권장되는 Tp/Su 병합제에 대하여 내성인 균주는 20주 (10%)였으며, 2004~2006년도에 분리된 99주 중에서는 8주 (8%)였다. KY1990, KY2000 및 DA2003의 3개 균별 내성빈도의 전체적인 차이는 없었으며, DA2003 균주들이 KY1990 및 KY2000 보다 Ak, Cd에 대한 내성빈도가 더 높은 것으로 보이지만 통계학적으로 유의하지 않았다 ($p>0.05$, by Chi square test).

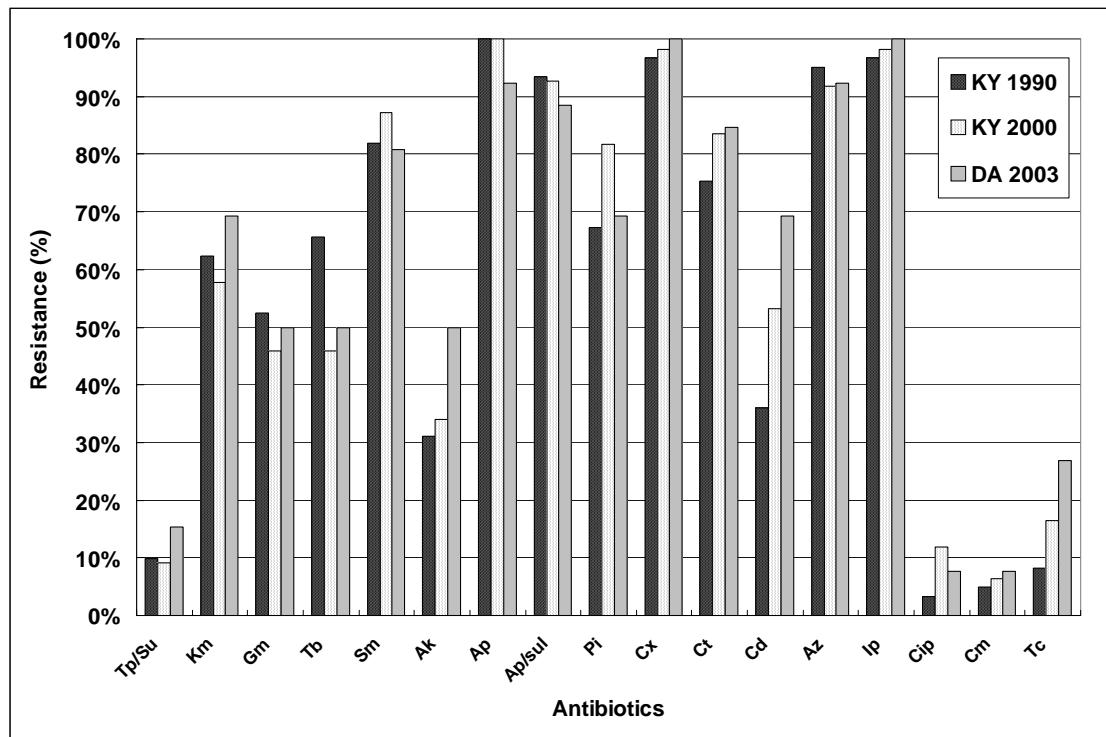


Figure 1. Resistance of *S. maltophilia* isolates against 18 antimicrobial agents. The lowest resistance rate of *S. maltophilia* isolates were for Cip, Cm, and Tp/Su, however, more than 90 % of isolates were resistant to Ap, Cx, Az, and Ip. Abbreviations: Tp: trimethoprim, Su: sulfamethoxazole, Km: kanamycin, Gm: gentamicin, Tb: tobramycin, Sm: streptomycin, Ak: amikacin, Ap: ampicillin, Ap/sul: ampicillin/sulbactam, Pi: piperacillin, Cx: cefoxitin, Ct: ceftaxime, Cd: ceftazidime, Az: aztreonam, Ip: imipenem, Cip: ciprofloxacin, Cm: chloramphenicol, Tc: tetracycline.

3. *S. maltophilia* 균주의 유전형 분석

제한효소 *Xba*I 처리한 *S. maltophilia* 균주의 PFGE 결과를 보면, *Xba*I으로 처리한 경우 절편의 수는 10~19개였으며, 평균은 14.8이었다 (Fig. 2). 반면 *Spe*I으로 처리한 경우 절편의 수는 6~16개였으며, 평균은 10.8로 나타나서 (data not shown) *Xba*I으로 처리한 경우가 분석에 더 적합한 것으로 나타났다. 따라서 제한효소 *Xba*I으로 처리한 PFGE profiles를 사용하여 균주간의 유사성을 분석하였다. Dendrogram 작성을 위해서 Dice similarity indices (optimization, 3%; position tolerance, 3%)를 사용하였으며, 80% 이상의 유사성을 나타내는 균주들을 동일한 클론으로 판정하였다 (Fig. 3).

같은 환자에서 중복하여 분리된 균주는 제외하면, 전체적으로 80% 이상 유사성을 나타내는 균주가 없이 다양한 유전적인 성상을 나타내었다. 따라서 조사한 기간 동안 동일한 균주에 의한 집단 발생이 없었음을 알 수 있었다. 예외적으로 분리된 시기와 장소가 다름에도 불구하고 유전적 유사성이 높은 경우도 있었으며 (03DXM34와 06K4, 03DXM12와 06K50), 같은 시기에 동일한 병원에서 분리된 균주들 사이에 유전적 유사성이 있는 1990년대의 균주와 DA 병원분리 균주

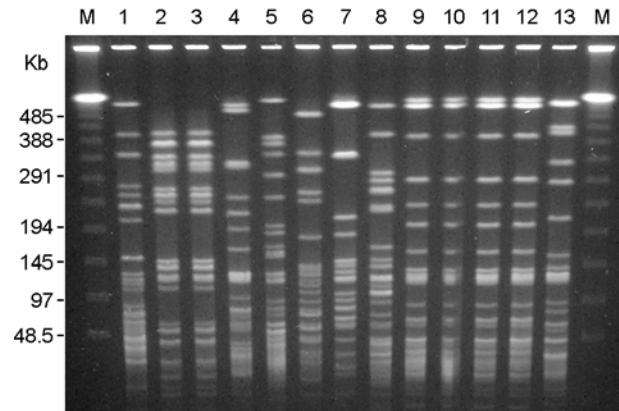


Figure 2. PFGE *Xba*I profiles of *S. maltophilia* isolates. Lanes M: lambda ladder DNA, lane 1: *S. maltophilia* ATCC 13637, lane 2: 05KST01 (HHH), lane 3: 05KST03 (HHH), lane 4: 05KST11, lane 5: 05KST12, lane 6: 05KST19 (III), lane 7: 05KST23 (EEE), lane 8: 05KST25 (FFF), lane 9: 05KST27 (DDD), lane 10: 05KST28 (DDD), lane 11: 05KST32 (DDD), lane 12: 05KST33 (DDD), lane 13: 05KST36. Parenthesis next to the isolates number means the patient.

에서 일부 있었으나, 대부분의 균주는 분리된 시기나 장소와 무관하게 유전적 유사성이 아주 낮은 것으로 나타났다.

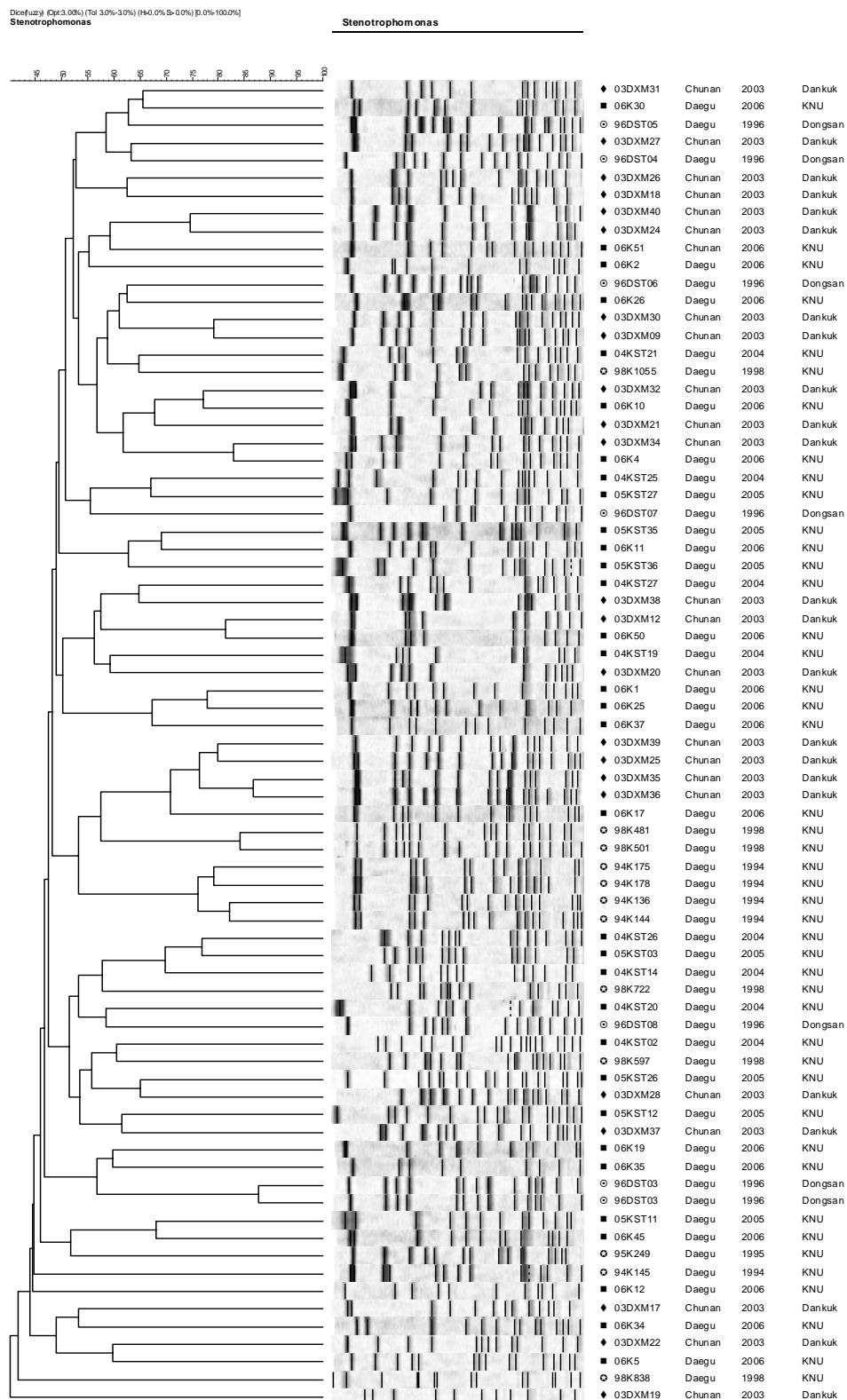


Figure 3. Dendrogram of PFGE *Xba*I profiles of *S. maltophilia* isolates from clinical specimens. Profiles for similarity were performed with Gel Compar II software with Dice similarity indices (optimization, 3%). Dendograms were generated by using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

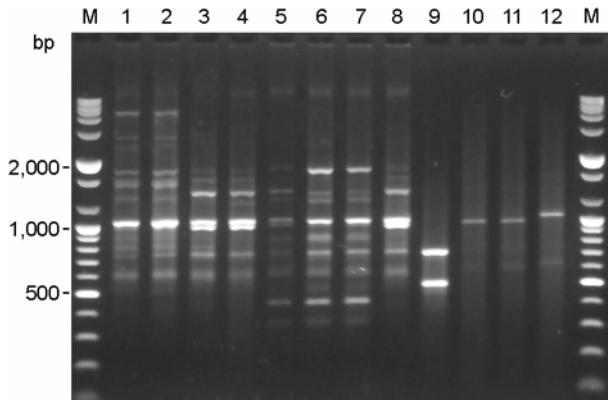


Figure 4. DNA fingerprinting profiles of RAPD of *S. maltophilia* with 10 mer primer. Lanes M: DNA size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, MBI fermentas, Canada), lane 1: 05KST23 (EEE), lane 2: 05KST24 (EEE), lane 3: 05KST25 (FFF), lane 4: 05KST26, lane 5: 05KST27 (DDD), lane 6: 05KST28 (DDD), lane 7: 05KST29 (DDD), lane 8: 05KST30 (FFF), lane 9: 05KST31, lane 10: 05KST32 (DDD), lane 11: 05KST33 (DDD), lane 12: 05KST36. Parenthesis next to the isolates number means the patient.

4. 동일한 환자에서 분리된 균주에 의한 RAPD 분석과 PFGE의 비교

S. maltophilia 균주는 RAPD 분석에서 다양한 유형들을 나타내었다. 증폭된 DNA 절편의 수는 균주별로 다양하였는데 범위는 1~10개였으며, 영동하여 분석한 크기는 400~2,000 bp 사이였다 (Fig. 4). 2004년부터 2005년 사이에 같은 환자로부터 2회 이상 분리된 *S. maltophilia* 균주들의 RAPD 결과를 dendrogram으로 표시하였으며 (Fig. 5A), 같은 균주들의 PFGE 결과 dendrogram을 표시하였다 (Fig. 5B). Fig. 2와 4에서 나타낸 균주들을 환자별로 분류하여 검체의 종류, 채취 날짜, 항균제 내성 유형과 함께 유전형을 표로 정리하였다 (Table 3).

환자 AAA로부터 분리한 04KST30, 04KST31 균주는 분리된 시점은 달랐지만, PFGE와 RAPD에 의한 유전형이 동일하였고, 표현형인 항균제 내성 유형도 일치하였다. 환자 GGG로부터 분리한 04KST20, 04KST24 및 환자 III로부터 분리

Table 3. Characteristics of *S. maltophilia* multiply isolated from the same patient from 2004 to 2005

Isolates No.	Patient	Date	Specimen	Same genotype ^a		Resistance pattern ^b							
				Y / Y	N / N	Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az	Cd	Pi
04KST30	AAA	Jul-04	Sputum	Y / Y				Km					
04KST31	AAA	Aug-04	Bronchial aspirates	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az	Cd	Pi
04KST01	BBB	Apr-04	Pus	Y / Y		Sm	Ap/sul		Ct	Cx	Az		Pi
04KST08	BBB	May-04	Pus	Y / N		Sm	Ap/sul	Gm		Cx	Az	Cd	Pi
04KST10	BBB	May-04	Pus	Y / Y			Ap/sul				Az		Pi
04KST02	CCC	Apr-04	Urine	N / N		Sm	Ap/sul	Tp/Su	Km	Gm	Ct		Pi
04KST04	CCC	Apr-04	Urine	N / N		Sm	Ap/sul		Gm	Ct	Cx	Az	Pi
05KST27	DDD	Jul-05	Blood	Y / Y		Sm	Ap/sul		Ct		Az	Cd	Pi
05KST28	DDD	Jul-05	Blood	Y / Y			Ap/sul		Ct		Az	Cd	Pi
05KST29	DDD	Jul-05	Blood	Y / Y		Sm	Ap/sul		Ct	Cx	Az	Cd	Pi
05KST32	DDD	Jul-05	Blood	Y / N			Ap/sul		Ct	Cx	Az	Cd	Pi
05KST33	DDD	Jul-05	Blood	Y / N			Ap/sul		Ct		Az		Pi
05KST23	EEE	Jun-05	Sputum	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az	Cd	Pi
05KST24	EEE	Jun-05	Sputum	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az		Pi
04KST20	GGG	Jul-04	Pleural fluid	Y / Y		Sm			Km				
04KST24	GGG	Jul-04	Pleural fluid	Y / Y		Sm			Km				
05KST01	HHH	Jan-05	Pus	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct		Az		Pi
05KST03	HHH	Jan-05	Pus	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Gm	Ct		Az	
05KST13	HHH	Mar-05	Sputum	N / N			Ap/sul	Tp/Su	Ct	Cx	Az		Pi
05KST19	III	Jun-05	Bile	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az	Cd	Pi
05KST20	III	Jun-05	Blood	Y / Y		Sm	Ap/sul	Km	Ct	Cx	Az	Cd	Pi

^a Same genotype by PFGE / RAPD, Y: yes, N: no.

^b Abbreviations: Sm: streptomycin, Ap/sul: ampicillin/sulbactam, Tp/Su: trimethoprim /sulfamethoxazole, Km: kanamycin, Gm: gentamicin, Ct: cefotaxime, Cx: cefoxitin, Az: aztreonam, Cd: ceftazidime, Pi: piperacillin

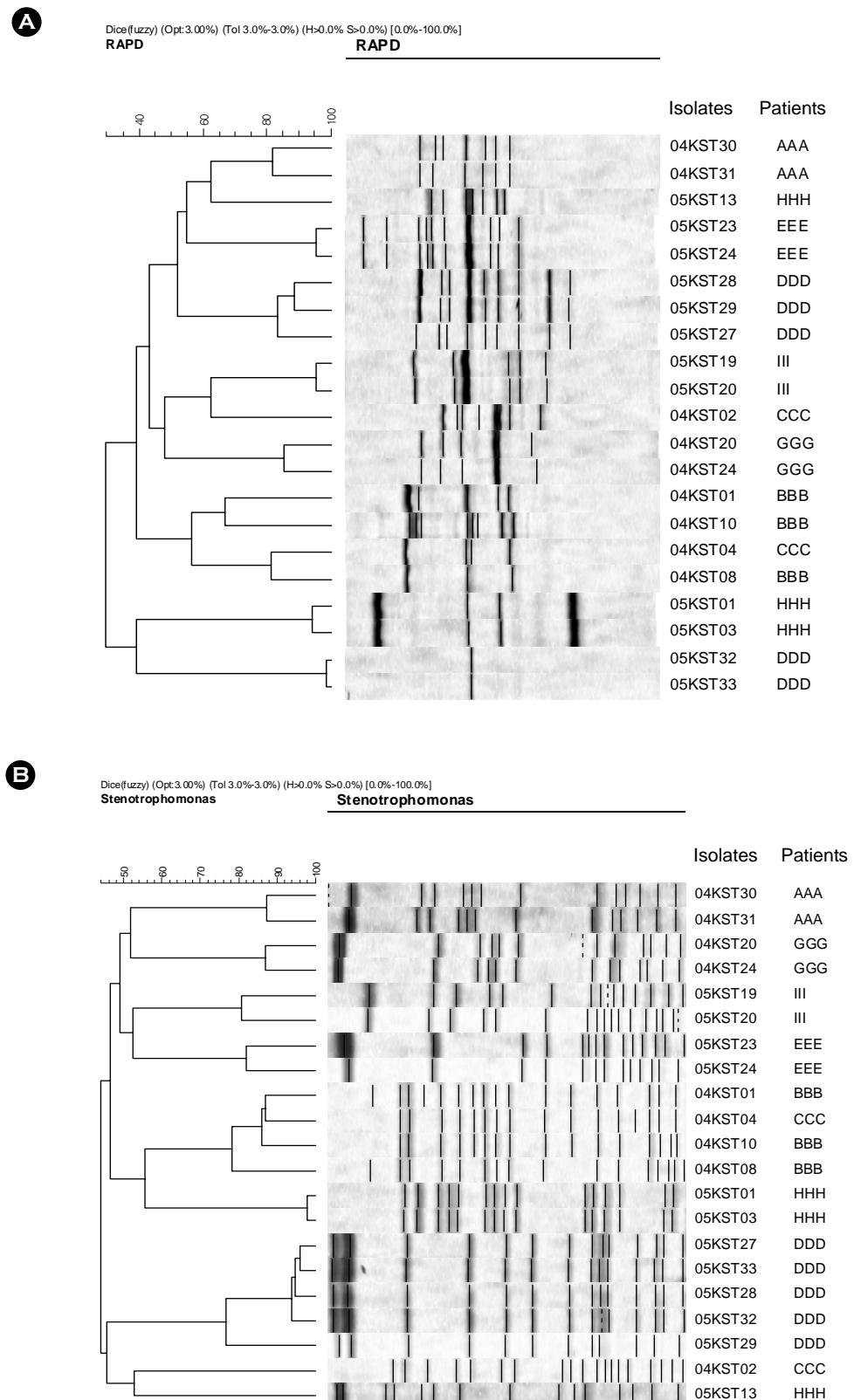


Figure 5. Dendrogram of *S. maltophilia* isolates from the same patients by RAPD (A) and PFGE (B). Fragments were analyzed using Dice similarity indices (optimization, 3%) and a dendrogram was drawn using unweighted-pair group method with arithmetic average (UPGMA).

한 05KST19, 05KST20도 같은 경우였다. 그러나 환자 BBB에서 분리된 균주인 04KST01, 04KST08, 04KST10의 경우는 항생제 내성 유형에서 조금 차이가 있었으며, 04KST08은 RAPD 분석에서 대부분의 절편이 같았지만, 절편의 수가 적어서 다른 그룹으로 분류되었다. 가장 많은 균주가 분리된 환자 DDD 유래 *S. maltophilia* 5주는 항생제 내성 유형은 조금씩 달랐지만, PFGE 유전형은 같은 그룹이었다. 환자 DDD 유래의 05KST32와 05KST33은 RAPD 분석에서는 하나의 절편만 나타나서 다른 균으로 분류되었다. RAPD의 결과는 대부분 PFGE의 결과와 일치하여 동일한 환자에서 분리된 균주들이 유전적으로 같은 것으로 나타났지만, 두 방법의 결과가 완벽하게 일치하지 않는 경우도 있었다.

PFGE와 RAPD 분석의 두 실험 모두에서 차이가 있는 것으로 나타난 환자 CCC 유래의 04KST02와 환자 HHH 유래의 05KST13은 같은 환자에서 분리된 균주들과 달리 Tp/Su에 내성이었다. 따라서 이 경우에는 다른 *S. maltophilia* 균주에 의한 재감염이 일어난 것으로 추측된다.

고 찰

*S. maltophilia*는 물이 있는 환경에서 잘 자라는 호기성 세균으로 강이나 하수와 같은 자연계 뿐만 아니라, 소변, 호흡기 분비물 등과 같은 병원환경에서도 자주 분리된다 (9). 이 균의 감염과 관련된 국내의 연구는 심판막염, 복막투석 관련 감염, 안과영역의 감염 등 넓은 범위에서 다루어졌다 (1,17). 이 균의 colonization 및 infection의 위험인자는 광범위 항생제의 투여, 장기간의 입원, 중환자실 입원, 인공호흡기 및 혈관내 삽관, 혈액종양, 호중성백혈구감소증 등이며, 다른 균에 대한 광범위 항생제 치료로 인하여 이 균의 colonization 및 infection이 유도된다고 알려져 있다 (25). 이 균의 직접 전파경로가 명확하게 밝혀진 것은 없으나, 이 균이 자연계에 널리 분포되어 있기 때문에 우연하게 숙주에 감염될 가능성이 있으며, 숙주의 면역능력이 떨어질 경우 질병으로 연결될 가능성이 제시되고 있다 (10,24).

이번 연구에서 수집된 *S. maltophilia*가 분리된 검체는 객담과 호흡기 관련 검체가 전체의 1/3 이상을 차지하여 가장 많았으며, 소변이 2번째로 흔한 검체였고, 고름 또는 혈액에서 분리된 경우가 많았다. 그러나 이 균에 의한 감염과 함께 colonization의 경우도 포함되어 있기 때문에 이에 대한 정확한 연구를 위하여 환자의 병력에 대한 상세한 검토가 있어야 할 것이다. 2004~2005년에는 7월에 가장 많이 분리되었으며, 여름에 분리된 균주가 대부분을 차지하는 것으로 보아 계절의 변화에 의한 환경의 영향이 감염과 관련되어 있음을 시사한다. *S. maltophilia*가 분리된 환자들의 병실을 살펴보면 내

과, 외과 및 신생아 중환자실을 포함한 중환자실에서 분리된 것이 20주, 일반병실에서 분리된 것이 25주로 이 균 감염의 위험인자인 중환자실 입원을 확인할 수 있었다.

1970년대부터 *S. maltophilia* 균의 분리에 대해 보고된 이후, 1980년대부터 1990년대까지는 *S. maltophilia*가 자연 내성을 가지고 있는 carbapenem 항생제 사용의 증가와 함께 이 균의 감염이 폭발적으로 증가한 것으로 보고되었다 (9). 2002년부터 2003년 사이에 영국, 웨일즈, 북아일랜드 지역에서 발생한 *S. maltophilia*에 의한 균혈증의 빈도가 8% 증가하였다고 보고하였으나 (13), Meyer 등 (19)이 2001년부터 2004년 2년까지 독일에 있는 34개 중환자실을 조사한 결과 1,000환자일 당 분리빈도는 평균 2.2였으며, 2001년 2.7에서 2004년 2.1로 큰 변화가 없었으며, *S. maltophilia* 병원감염의 빈도 역시 평균 0.134로 (2001년 0.173에서 2004년 0.191) 크게 변화가 없다고 보고하였다. 국내 병원에서 분리된 그람음성균의 균종별 분리빈도의 추이를 보면 *S. maltophilia*의 분리빈도는 1993년에 3.1%에서 2003년에는 4.7%로 다른 균종에 비하여 분리빈도가 급격하게 증가하였다 (16). 이번 연구에서도 1990년대 후반보다 2000년 이후에 분리된 균주의 수가 많았지만, 병원에서 분리되는 모든 균들이 조사되었는지에 대한 의문이 있다. 따라서 colonization과 감염의 구별과 함께 이 균의 분리빈도에 대한 정확한 결과를 얻기 위해서는 집중적이고 구체적인 계획과 협조 하에서 상세한 병원 환자기록의 분석이 필요할 것으로 생각된다.

*S. maltophilia*에 의한 감염의 치료에 일차 선택약으로 추천되는 것은 Tp/Su이다. Tp/Su에 대한 내성빈도는 아시아-태평양 지역은 약 8%, 미주지역은 약 5%, 유럽은 10%로 보고되었으나, 보고에 따라 빈도의 차이가 있다 (11,14). 이번 연구에서는 나타난 Tp/Su에 대한 내성빈도는 10%였다. *S. maltophilia*는 자연적으로 extended-spectrum penicillin, 3세대 cephalosporin 및 carbapenem을 포함한 대부분의 β -lactam 항생제와 아미노배당체 항균제에 내성을 나타내며, fluoroquinolone 항생제에 대해서도 다양한 감수성을 보인다고 보고되었다 (9,22,25). *S. maltophilia*가 보유한 efflux 기전 중에서 Sme-ABC는 Cip의 배출에, SmeDEF는 meropenem 항생제의 배출에 관여한다고 알려져 있다 (5). 이번 연구에서 수집된 균주의 Cip에 대한 내성빈도는 10% 정도로 낮았다. 그러나 quinolone의 내성판정기준이 되는 표준 breakpoint가 확실하지 않고 *S. maltophilia*의 경우에 Cip와 ofloxacin 같은 quinolone에 대한 감수성 균의 MIC가 흔히 breakpoint 주변에 몰려있기 때문에 현재의 이러한 결과는 조심스럽게 해석되어야 할 것으로 보인다 (1,22,23). 이 균의 대부분은 Ip에 자연 내성을 나타내며, 3세대 cephalosporin을 포함한 대부분의 β -lactam 항균제와 아미노배당체 항균제에 내성을 나타낸다. 따라서

Ip와 3세대 cephalosporin의 사용은 이 균 감염의 가능성을 높이게 되므로 이러한 항균제를 자주 사용하는 병원에서는 더 높은 비율로 원내감염의 원인균으로 분리되어 임상적으로 문제가 된다 (2,8). 이번 연구에서 분리된 균주들은 거의 모두가 Ip과 3세대 cephalosporin을 포함한 대부분의 β -lactam 항균제에 내성이었다.

S. maltophilia 균주에 의한 원내감염의 역학조사를 위한 형별검사 방법 중에서 PFGE 방법은 시행이 다소 까다롭고 시간이 많이 걸린다는 단점은 있으나, 처리 및 실험 조건에 대한 표준화를 통하여 실험실 내에서나 실험실 간에 재현성이 높다는 장점이 있어 균주의 형별검사 방법으로 현재까지는 가장 좋은 것으로 알려져 있다 (29). PCR을 이용한 형별검사 방법으로 신속하고 간단하면서 비용도 적게 드는 RAPD 검사법은 PCR의 높은 감수성으로 인하여 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있다 (7,18,27). 이번 연구에서 나타난 결과를 보면, 대부분의 균주는 RAPD 형별과 같은 PFGE 형별로 분류가 되었으나, 일부 균주가 다른 것으로 나타났다. 따라서 RAPD 방법은 간단하게 시행할 수 있다는 점에서 1차 검색목적으로 시행하고, 정확한 유전형의 판별을 위해서는 반드시 PFGE로 확인하여야 할 것으로 생각된다.

설 등 (1)은 1990년대에 분리한 *S. maltophilia* 68주 중에서 14주의 균주를 대상으로 PFGE와 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR을 시행하여 그 결과가 일치한다고 하였으며, 10개의 그룹으로 분류하였다. 그리고 동일한 유형에 속한 창상유래 균주는 표현형과 유전형이 일치하여 공통의 감염원에서 유래한 것으로 보고하였다. 이번 연구에서 분리된 균주들의 PFGE는 아주 다양한 양상으로 나타났으며, 같은 환자에서 분리한 균주들만이 동일한 유전형으로 분류되었을 뿐 지속적으로 유행하는 균주는 발견되지 않았다. 과거에 비하여 병원내 감염의 관리가 강화된 사설을 반영한 결과로 추측된다.

*S. maltophilia*의 감염원은 병원에 있는 모든 액체나 기구를 포함한 병원환경이다. 이 균은 환자의 정상 균무리의 일부로 존재하기도 하며, 혈액종양 환자의 변에서는 높은 빈도로 검출되고, 병원 종사자의 호흡기, 인두, 및 손에서도 검출된다 (25). Cystic fibrosis 환자의 경우 이 균은 한 환자에서 6개월 이상 지속적으로 colonization되기도 하지만, 일반적인 병원 환경에서는 8.5 ± 6.5 일 정도로 생각보다 짧다 (26). Berg 등 (3)이 4년 동안 같은 병원에서 환자 유래주, 병원의 소독약제에서 분리한 균주, 물이 있는 환경에서 분리한 균주, 식물 관련 균주와 함께 표준균주의 유전적 다양성을 조사한 결과 유래에 따른 유전적 유사성이 발견되지 않았고, 특정 클론이 발견되지 않았으며, 유전형이 다양하다고 하였다. 이번 연구에서는 같은 환자에서 중복하여 분리된 균주를 제외하면,

80% 이상의 유사성을 나타내는 균주가 없이 다양한 유전적인 성상을 나타내었으며, 지역이나 분리된 병원에 따른 특정 클론이 발견되지 않았다. 즉 공통적인 감염원에 의한 집단적인 감염이라기보다 사람들이 다양한 환경에 서식하는 *S. maltophilia*를 획득하여 colonization 되었다가 숙주의 면역 저하 또는 위험인자에 노출되면서 감염된 것임을 시사한다.

병원감염과 일반사회 감염의 감별 및 colonization과 infection을 감별할 수 있는 임상자료의 정리가 필요하며, 이를 근거로 더 분명한 감염이나 전파경로의 파악이 가능하다. 따라서 차기 연구는 반드시 정확하고 상세한 임상자료가 제시되는 연구로 수행되어야 할 것으로 생각된다. 이 균에 의한 감염이 앞으로도 많이 발생할 것이 예상되므로 환자 발생할 경우에는 감염된 환자에 의한 균의 전파를 차단하기 위한 즉각적인 조치가 필요하며, 오염원에 대한 조사를 즉각 시행하여 병원환경에서 가능한 원인을 신속히 제거할 수 있는 감염 차단의 시스템의 수립이 병원단위에서 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 설성용, 장경수, 정웅기, 조응래, 김능희, 유학선, 이유철: 병원 재료에서 분리한 *Stenotrophomonas maltophilia*의 항균제 내성 및 분자역학적 특성. 대한미생물학회지 35: 239-250, 2000.
- 2) Babalova M, Blahova J, Lesicka-Hupkova M, Krcmery V Sr., Kubanova K: Transfer of ceftazidime and aztreonam resistance from nosocomial strains of *Xanthomonas* (*Stenotrophomonas*) *maltophilia* to a recipient strain of *Pseudomonas aeruginosa* ML-1008. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14: 925-926, 1995.
- 3) Berg G, Roskot N, Smalla K: Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Clin Microbiol 37: 3594-3600, 1999.
- 4) Bingen EH, Denamur E, Lambert-Zechovsky NY, Bourdois A, Mariani-Kurkdjian P, Cezard JP, Navarro J, Elion J: DNA restriction fragment length polymorphism differentiates crossed from independent infections in nosocomial *Xanthomonas maltophilia* bacteraemia. J Clin Microbiol 29: 1348-1350, 1991.
- 5) Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ: Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 53: 518-521, 2004.

- 6) **Chang N, Chui L:** A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31:** 275-279, 1998.
- 7) **Chatelut M, Dournes JL, Chabanon G, Marty N:** Epidemiological typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by PCR. *J Clin Microbiol* **33:** 912-914, 1995.
- 8) **Chow AW, Wong J, Bartlett KH:** Synergistic interactions of ciprofloxacin and extended-spectrum beta-lactams or aminoglycosides against multiple drug-resistant *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **32:** 782-784, 1988.
- 9) **Denton M, Kerr KG:** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **11:** 57-80, 1998.
- 10) **Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM:** Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol* **36:** 1953-1958, 1998.
- 11) **Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J:** Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997~1999). *Clin Infect Dis* **32:** S104-S113, 2001.
- 12) **Gerner-Smidt P, Bruun B, Arpi M, Schmidt J:** Diversity of nosocomial *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) as determined by ribotyping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14:** 137-140, 1995.
- 13) **HPA:** *Pseudomonas* spp and *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: England, Wales, and Northern Ireland 2003. *CDR Weekly Volume* **14:** 1-7 No 43, 2004.
- 14) **Jones RN, Sader HS, Beach ML:** Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997~2001). *Int J Antimicrob Agents* **22:** 551-556, 2003.
- 15) **Sader HS, Jones RN:** Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* **25:** 95-109, 2005.
- 16) **Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, Yoon SW, Chang HS, Chang KH, Lee SI, Lee MS, Song JH, Kang MW, Park SC, Choe KW, Pai CH:** Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. *Am J Infect Control* **28:** 454-458, 2000.
- 17) **Kim JH, Kim SW, Kang HR, Bae GB, Park JH, Nam EJ, Kang YM, Lee JM, Kim NS:** Two episodes of *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis of prosthetic mitral valve: report of a case and review of the literature. *J Korean Med Sci* **17:** 263-265, 2002.
- 18) **Laing FP, Ramotar K, Read RR, Alfieri N, Kureishi A, Henderson EA, Louie TJ:** Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. *J Clin Microbiol* **33:** 513-518, 1995.
- 19) **Meyer E, Schwab F, Gastmeier P, Ruden H, Daschner FD:** Is the prevalence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation and nosocomial infection increasing in intensive care units? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25:** 711-714, 2006.
- 20) **Morrison AJ Jr, Hoffmann KK, Wenzel RP:** Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial *Pseudomonas maltophilia* in a university hospital. *J Clin Microbiol* **24:** 52-55, 1986.
- 21) **National Committee for Clinical Laboratory Standards:** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved document M7-A6, Wayne, Pa. 2003.
- 22) **Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC:** Susceptibilities of 123 *Xanthomonas maltophilia* strains to clinafloxacin, PD 131628, PD 138312, PD 140248, ciprofloxacin, and ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **38:** 369-370, 1994.
- 23) **Poulos CD, Matsumura SO, Willey BM, Low DE, McGeer A:** In vitro activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **39:** 2220-2223, 1995.
- 24) **Schmitz FJ, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC:** Typing of 154 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and determination of the in vitro susceptibilities of these strains to 28 antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **45:** 921-923, 2000.
- 25) **Senol E:** *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* **57:** 1-7, 2004.
- 26) **Valdezate S, Vindel A, Martin-Davila P, Del Saz BS, Baquero F, Canton R:** High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol* **42:** 693-699, 2004.

- 27) **VanCouwenberghe CJ, Cohen SH, Tang YJ, Gumerlock PH, Silva J Jr.**: Genomic fingerprinting of epidemic and endemic strains of *Stenotrophomonas maltophilia* (*formerly Xanthomonas maltophilia*) by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 1289-1291, 1995.
- 28) **Whitby PW, Carter KB, Burns JL, Royall JA, LiPuma JJ, Stull TL**: Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *J Clin Microbiol* **38**: 4305-4309, 2000.
- 29) **Yao JD, Conly JM, Krajden M**: Molecular typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **33**: 2195-2198, 1995.